مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و دوم- پائیز۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

طراحی و ساخت نانو داروهای مهار کننده پمپ افلاکس در جدایه‌های بالینی *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم

سمانه طاهریان فرد [۱]، انوش اقدامی [*۲]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پمپ‌های افلاکس نقش کلیدی را در مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها ایفا می‌کنند. *اسینتوباکتربومانی* یکی از مهم ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی که به‌واسطه ایجاد مقاومت های آنتی‌بیوتیکی، مشکلات فراوانی در درمان موفقت‌آمیز آن ایجاد شده است. این مطالعه با هدف تعیین نقش بازدارندگی پمپ‌افلاکس در مقاومت دارویی سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی۱۳ ایزوله *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم، از ۶۰ نمونه زخم بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی نانوذره‌ها با روش براث میکرودایلوشن بر طبق CLSI[۱] ،بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ‌افلاکس و اثر مهاری نانوذره‌ها بر این پمپ‌ها با روش کارت ویل آگار اتیدیوم بروماید[۲] انجام شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر نانو ذره ی آلبومین ایمی پنم فاقد اثر ضد میکروبی بر *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به ایمی‌پنم بود .اما نانوذره آلبومین ۰/۵و ۰/۰۵گرم به‌ترتیب با ۱۶ µg/ml، ۰/۱۲۵ µg/ml = MIC[۳] دارای اثر مهاری بر باکتری مذکور بودند. ۷۵٪ از سویه‌ها دارای پمپ‌افلاکس فعال بودند. نانوذره آلبومین ۰/۵گرم پمپ‌افلکس ۳۷٪ از سویه‌ها را در حداقل غلظت اتدیوم بروماید[۴] مهار کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج، ارتباط MIC با فعالیت پمپ‌افلاکس باکتری را نشان داد. هم‌چنین با توجه به فعالیت ۷۵٪ پمپ‌های افلاکس در سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم طراحی و ساخت مهار کننده‌های پمپ‌افلاکس حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم، پمپ‌افلاکس، نانوذره،MIC

نویسنده مسئول:
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد
ساوه، ساوه، ایران
پست الکترونیکی: eghdami49@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute
[2] Ethidium Bromide-agar Cartwheel method
[3] Minimum Inhibitory Concentration
[4] Ethidium Bromide

مقدمه

از زمان شناخت باکتری‌ها، بشر همواره در پی یافتن دارویی موثر علیه عفونت‌های ناشی از آن‌ها بوده است و باکتری‌ها نیز به مکانیسم‌های مؤثر جهت از بین بردن آنتی‌بیوتیک‌ها دست یافتند. امروزه با پیدایش مقاومت دارویی در میان باکتری‌های بیماری‌زا، درمان این دسته از بیماری‌های عفونی با مشکلات بسیاری مواجه شده است (۱۴).

*اسینتوباکتربومانی*کوکو باسیل فرصت‌طلب، گرم منفی، هوازی، غیرتخمیری، اکسیداز منفی و شایع‌ترین گونه‌ای است که به‌عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی به‌طور معمول در عفونت‌های مرتبط با وسایل پزشکی از خون، خلط ، پوست، مایع پلور و ادرار جدا شده است (۱۹،۶،۳). این باکتری از طریق زخم‌های باز، سوندها و مجاری تنفسی وارد بدن شده و عامل بیماری‌های مهمی چون پنومونی، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری، اندوکاردیت و عفونت‌های سوختگی محسوب می‌شود (۷).

اسینتوباکتر دارای مکانیسم‌های بروز مقاومت به اغلب کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز توانایی بالایی برای گسترش مقاومت سریع به داروهای مختلف است. تا به امروز برخی از سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* به تمام عوامل ضدمیکروبی موجود مقاوم شده‌اند و از این‌رو داروهای مؤثر به‌منظور درمان بسیار محدود هستند (۲۷). شایع‌ترین عوامل مرتبط با مقاومت در *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به چند دارو (MDR[۵]) شامل ژن های سفالوسپورینار AmpC، کارباپنمازهای نوع OXA، متالوبتالاکتامازها [MBLs]، پمپ‌های افلاکس و اینتگرون‌ها هستند. کارباپنم‌ها از جمله اولین انتخاب‌های درمانی در درمان عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتربومانی* هستند. متأسفانه مقاومت به کارباپنم‌ها بین ایزوله‌های بالینی و محیطی *اسینتوباکتر* بسیار گزارش شده است (۳۶،۲۷) .

پمپ‌های افلاکس چند دارویی به‌خاطر تنوع وسیع سوبسترایی، اثرهای ناشی از افزایش بیان آن‌ها ، همراهی و اثر سینرژیسمی آن‌ها با دیگر مکانیسم‌های مقاومت نقش مهمی درپدیدار شدن سویه‌های MDR دارند (۱۲). این پمپ‌ها نه‌تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (MIC) می‌گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها می‌گردند (۲۰). به‌دلیل وفور پمپ‌های افلاکس در *اسینتوباکتربومانی* یافتن داروهای جدید علیه این اهداف نوین درمانی اهمیت دارد (۲).

به‌طورکلی باکتری‌ها از نظر ایجاد مقاومت اکتسابی و ذاتی نسبت به داروهایی که به‌عنوان عوامل درمانی به‌کار می‌روند توانایی ژنتیکی دارند (۷)؛ بنابراین بایستی اقدام‌هایی به‌منظور کاهش مقاومت باکتریایی انجام گیرد که یکی از این راه‌ها، کشف داروهای جدید از منابع طبیعی وصناعی است (۲۶).

در سال‌های اخیر فناوری نانو توانسته است تحول‌های عمیقی در زمینه پژوهش و تولید محصول‌ها ایجاد کند (۵).

نانوذره‌ها، ذره‌هایی پراکنده شده و یا جامد با اندازه‌ای در محدود ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند (۳۷). این ذره‌ها دارای سطح ویژه بالا بوده و خواص منحصر به‌فرد فیزیکی و شیمیایی آن‌ها مثل حلالیت، بار سطحی، اثر کوانتومی، تجمع‌پذیری و ... (۴) به اندازه، شکل و غلظت ذره‌هایشان بستگی دارد (۲۵). این ذره‌ها در چرخه حیات و اکوسیستم پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند. لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد (۲).

در حال حاضر نانوتکنولوژی در زمینه نانوآنتی‌بیوتیک نیز سودمند است. این تکنولوژی به‌وسیله دست‌کاری در اندازه و مقیاس باعث افزایش عمل‌کرد این مواد می‌شود (۱).

به‌طور مثال نانوذره‌های آمپی‌سیلین در درمان سالمونلا مؤثرتر از خود دارو بودند (۳۴). نانوذره‌های آمفوتریسین B موجب کاهش نفروتوکسیسیته این دارو شدند (۳۳).

هم‌چنین نانوذره‌ها حاوی آمپی‌سیلین اثر بسیار خوبی بر روی عفونت لیستریوزیس ایجاد شده در موش‌های بدون تیموس داشتند (۳۵).

متأسفانه با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های قوی‌تر، خطر افزایش بیماری‌های عفونی جان انسان‌ها را تهدید می‌کند (۲۹). در نتیجه این مطالعه با هدف سنتز نانودارو و به‌کار گیری آن برای مهار پمپ‌افلاکس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، انجام شد.

روش کار

در این مطالعه مقطعی که طی ۶ ماه از مردادماه ۱۳۹۵ تا دی‌ماه ۱۳۹۵ انجام شد، نمونه‌ها از بیماران بستری در بخش‌های

[۵] Multi Drug Resistant

مختلف بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری شد. برای جداسازی باکتری‌ها در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بالینی ایزوله‌های *اسینتوباکتربومانی* با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شدند؛ سپس به‌منظور بررسی مقاومت دارویی این باکتری به داروی ایمی‌پنم تست آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (۱۱) برای این آنتی‌بیوتیک انجام شد.

به‌دلیل اهمیت بیش‌تر آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم و با توجه به اینکه به‌تازگی باکتری مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم مقاومت دارویی ایجاد کرده است، این مطالعه بر *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم[6] متمرکز شد.

۱ – سنتز نانوذره‌ها (۲۴)

تشکیل نانوذره‌ها با استفاده از روش توده‌ای شدن ساده (desolvation) انجام شد.

الف – سنتز نانوذره‌های آلبومین[7]

سرم آلبومین گاوی[8] (مرک آلمان) با دو مقدار ۰/۵ و ۰/۰۵ گرم در دو بشر مجزا در ۱۰cc محلول ۱۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (NaCl) حل شد و با استفاده از محلول ۰/۱ نرمال هیدروکسید سدیم (NaOH) PH محلول به ۹ رسانده شد. درمرحله بعد اتانول به‌عنوان ضد حلال به محلول پروتئین اضافه شد. پس از تشکیل نانوذره‌ها با افزودن گلوتار آلدهید[9](مرک آلمان) ذره‌ها تثبیت شدند و عمل اختلاط به‌مدت ۲۴ ساعت توسط هم‌زن مغناطیسی انجام شد.

برای خالص‌سازی از سانتریفیوژ یخچال‌دار (VISION) با دور 0rpm ۱۴۵۰۰به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

ب – سنتز نانوذره آلبومین- ایمی پنم (نانو داروی ایمی-پنم[10])

ابتدا ۰/۱ گرم از سرم آلبومین گاوی در ۵ میلی لیتر از محلول آبی دارو ایمی‌پنم[11] (شرکت سیگما)، در دمای اتاق انکوبه شد. سپس cc ۰/۵ اتانول به‌عنوان ضد حلال به محلول اضافه شد و داخل لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ریخته شد. این محلول به‌مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۵۵۰ سانتریفیوژ شد؛ سپس ۲ میلی‌لیتر دیگر از محلول آبی دارو اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد. با افزودن گلوتار آلدهید ذره‌ها تثبیت شدند.

عمل اختلاط به‌مدت ۲۴ ساعت توسط هم‌زن مغناطیسی انجام شد.

برای خالص‌سازی از سانتریفیوژ یخچال‌دار (VS-15000CFN (II با دور rpm ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد.

۲- تهیه سوسپانسیون باکتری

سوسپانسیون میکروبی استاندارد براساس ۰/۵ مک‌فارلند (معادل CFU/ML $۱/۵\times۱۰^{۸}$باکتری) تهیه شد به‌این صورت که:

چند کلنی ازباکتری *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم در ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل شد و در ۲۵ درجه-سانتی‌گراد انکوبه شد؛ سپس کدورت آن هم به‌صورت چشمی و هم با دستگاه اسپکتروفتومتر(JENWAY 6305) سنجیده شد.

بررسی تشکیل نانوذره‌ها با استفاده از دستگاه FTIR انجام شد.

۳– بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذره‌ها

بررسی اثر ضدمیکروبی با استفاده از روش MIC به طریق میکرو براث دایلوشن انجام شد.

روش سنجش تعیین حداقل غلظت مهارکننده به‌طریق میکروبراث با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث (مرک آلمان)، مواد ضدمیکروبی(IND و ANPs) و سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند طبق کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (NCCLS) انجام شد.

روش‌های محاسباتی رقت‌ها برطبق دستور کار انستیتو پاستور۲۰۱۲ انجام شد به این‌صورت‌که ابتدا رقت‌هایی با غلظت نهایی (۲،۱۲۸۰،۱۶۰،۲۰/۵ µg/ml) از مواد ضدمیکروبی تهیه و پس از آن ۱۴ رقت بعدی (۰/۰۶۲۵-۵۱۲µg/ml) ،از ۴ رقت اولیه تهیه شد. (تمامی مرحله‌ها داخل میکروتیوب‌های استریل انجام شد.)

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر ۱۴ رقت ثانویه ماده ضدمیکروبی داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و ۱۰۰

[6] Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii*
[7] Albumin Nano Particles
[8] Bovine Serum Albumin
[9] Glutaraldehyde
[10] Imipenem Nano Drug
[11] Imipenem

میکرولیتر هم از سوسپانسیون باکتری (نیم مک‌فارلند که ۱۰۰ برابر رقیق شده) به هر چاهک اضافه شد، در نهایت حجم هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر شد. میکروپلیت به‌مدت ۲۴- ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد.

میزان کدورت (رشد باکتری) با دستگاه الایزا-anthos 2020) (GF2255011 سنجیده شد.

درمورد هر یک از رقت‌ها تست میکرو دایلوشن به‌صورت ۳ بار تکرار صورت گرفت.

۱۰۰µl از سوسپانسیون میکروبی رقیق شده باکتری *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم به‌عنوان کنترل مثبت و ۱۰۰µl از رقت ۵۱۲µg/ml مواد ضدمیکروبی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

پایین‌ترین غلظتی از ماده ضدمیکروبی که مانع رشد باکتری - شد به‌عنوان MIC یادداشت گردید.

۴- بررسی فنوتیپی پمپ‌افلاکس با استفاده از روش کارت ویل آگار- اتیدیوم بروماید

سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم بر روی پلیت-های TSA[12] (مرک آلمان) حاوی غلظت‌های متفاوت (mg/l ۲-۰) EtBr (شرکت سیگما) به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. میزان فلوروسنت هر جدایه با دستگاه ژل داکت (VILBER LOURMAT B.P.66 TORCY-Z.I.SUD) اندازه‌گیری شد (۲۲).

به‌صورت یک خط از مرکز محیط به سمت کنار محیط، کشت داده شدند (تصویر ۱).

اسینتوباکتربومانی استاندارد ATCC19606 به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (۲۳).

(هر پلیت (محیط کشت: تریپتیک سوی آگار + اتیدیوم بروماید[13]) شامل ۸ سویه از باکتری *اسینتوباکتربومانی* مقاوم به ایمی‌پنم بود.)

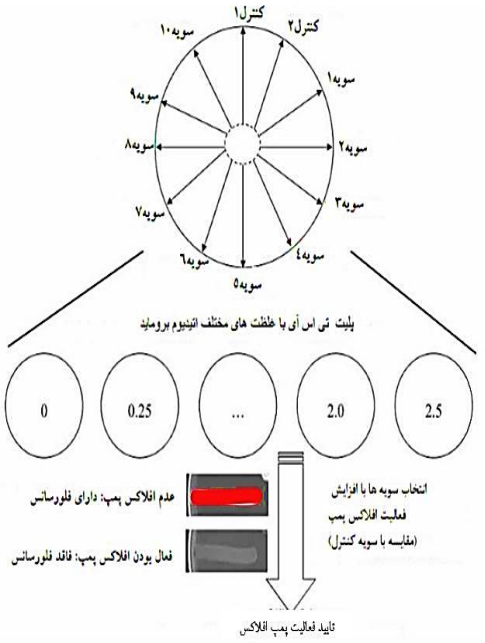
این روش به دو صورت انجام شد:

الف – بدون عامل ضدمیکروبی

سوسپانسیون باکتری *IRA* (مطابق نیم مک‌فارلند) بر روی محیط کشت TSA با غلظت‌های متفاوت EtBr کشت داده شد .

ب – با عامل ضدمیکروبی

میزان مساوی از سوسپانسیون میکروبی باکتری *IRA* (مطابق نیم مک‌فارلند) با رقت مشخصی از مواد ضدمیکروبی (IND و ANP ۰/۵ gr) مخلوط و بر روی این محیط‌ها کشت داده شد.



تصویر ۱:روش کارت ویل آگار- اتیدیوم بروماید

یافته‌ها

طیف‌سنجی فروسرخ (FT-IR)

از آن‌جاکه گروه-های عاملی مختلف، دارای جذب در فرکانس‌های مشخصی هستند، بنابراین طیف سنجی-FT IR به‌عنوان وسیله‌ای مناسب برای تعیین ساختار و تغییرهای ساختاری در بیوپلیمرها معرفی می‌شود (۱۳).

هدف اصلی از آنالیز طیف سنجی FT-IR در این پژوهش، شناسایی گروه‌های عاملی داروی ایمی‌پنم و نانوذره‌ها آلبومین و سپس تشخیص تشکیل نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم (ساختار جدید)بود.

وجود پیک‌های مربوط به گروه عاملی الکل (ROH) و آروماتیک‌ها در نانوذره‌های آلبومین و نانوذره آلبومین- ایمی-پنم، پیک‌های مربوط به گروه‌های عاملی کربوکسیل

[12] Tryptic soy agar
[13] Ethidium Bromide

(RCOOH) و (CH) در دارو و نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم؛ شکل‌گیری درست نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم را تأیید کرد. در ضمن مشاهده پیک جدید با عدد موج ۱۱۲۱ مربوط به گروه عاملی آمین (NH یا NH_2) نشان دهنده تشکیل ماده‌ای با ساختار جدید (نانو ذره آلبومین- ایمی‌پنم) بود (تصویر۲).

نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم فاقد اثر مهاری بر باکتری اسینتوباکتربومانی مقاوم به ایمی‌پنم بود (با توجه به کنترل مثبت). نانوذره آلومین ۰/۵گرم با MIC= ۰/۱۲۵ µg/ml اثر مهاری بیش‌تری نسبت به نانوذره آلبومین ۰/۰۵ گرم با µg/ml MIC= ۱۶ داشت (نمودار ۱).

در روشCW ایزوله‌ها بر طبق فلورسانس گسیلی به سه دسته تقسیم می‌شوند. (در غلظت‌های کم اتیدیوم بروماید، پمپ-افلاکس باکتری فعال بود در نتیجه اتیدیوم بروماید را از خود دور کرده رنگ قرمزی روی سویه‌ها دیده نشد. (بدون فلورسانس گسیلی) اما به‌تدریج با افزایش میزان اتیدیوم بروماید پمپ‌افلاکس قادر به خارج کردن این میزان اتیدیوم بروماید از باکتری نبود؛ در نتیجه رنگ قرمز روی سویه‌ها دیده شد (گسیل فلورسانس).

-CW(بدون سیستم ایفلاکس فعال): ایزوله‌هایی که گسیل فلورسانس را در غلظتmg/l EtBr (۱/۵-۰) نشان می‌دهند. هیچ‌یک از سویه‌ها در این دسته قرار نگرفتند.

-CW+/: ایزوله‌هایی که گسیل فلورسانس را در غلظت mg/l EtBr (۲-۱/۵) نشان می‌دهند. ۲۵٪ سویه‌ها در این دسته قرار گرفتند.

+CW (سیستم ایفلاکس فعال): ایزوله‌هایی که گسیل فلورسانس را تنها در mg/l EtBr ۲/۵ نشان می‌دهند. ۷۵٪ سویه‌ها در این دسته قرار گرفتند (۳۱).

نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم فاقد اثر مهاری بر پمپ‌افلاکس باکتری *اسینتوباکتربومانی مقاوم به ایمی‌پنم* بود (مشاهده رنگ قرمز (گسیل فلورسانس) ؛ اما نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم پمپ-افلاکس ۳۷٪ سویه‌ها را در حداقل غلظت mg/l EtBr ۰/۵-۰ مهار کرد.

بحث

امروزه پمپ‌های افلاکس فعال به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها مطرح هستند (۱۶).

در این مطالعه ۷۵٪از سویه‌های *اسینتوباکتربومانی مقاوم به ایمی‌پنم* دارای پمپ‌افلاکس فعال بودند. نانوذره آلبومین-ایمی‌پنم فاقد اثر مهاری برپمپ‌افلاکس سویه‌های مذکور بود و نانوذره ۰/۵ گرم با µg/ml MIC= ۰/۱۲۵ پمپ‌افلاکس ۳۷٪ سویه‌های مورد مطالعه رادر حداقل غلظت EtBr مهار کرد.

این نتایج ارتباط مهار پمپ‌افلاکس با اثر باکتریواستاتیکی ماده ضدمیکروبی را نشان می‌دهد. به‌عبارتی مهار پمپ‌افلاکس باعث کاهش MIC و افزایش قدرت باکتریواستاتیکی و یا باکتریوسایدی ماده ضدمیکروبی می‌شود.

در مطالعه Gholami در سال ۱۳۹۲ غیرفعال کردن پمپ-افلاکس سویه‌های *IRA* به‌وسیله PAβN ،[14] MIC را در ۷٪ از سویه‌ها ۴ تا ۶۴ برابر کاهش داد (۱۵).

Ruzin و همکاران در سال ۲۰۱۰با مطالعه ایزوله‌های بالینی *اسینتوباکتربومانی* نشان دادند که ارتباط معنی‌داری میان میزان بیان پمپ‌افلاکس و میزان MIC وجود دارد (۱۷). نیک آسا و همکاران در سال ۱۳۸۷ نشان دادند که میزان MIC در حضور ماده مهارکننده پمپ‌افلاکس در سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* جداشده از نمونه‌های بیمارستانی شهر تهران کاهش می‌یابد (۳۰).

Zhu و همکاران در سال۲۰۱۷ نشان دادند که مقادیر MIC در تمامی سویه‌های حساس به داروی ایمی‌پنم، آمیکاسین و نیتلمایسین با افزودن ماده مهارکننده پمپ‌افلاکس باکتری (CCCP[15]) کاهش قابل توجهی ندارد. که نشان دهنده فنوتیپ منفی پمپ‌افلاکس در این سویه‌ها است این در حالی-است که در سویه‌های مقاوم به آمیکاسین و نیتلمایسین در بیش از ۹۰٪ سویه‌های مورد مطالعه کاهش مقدار MIC مشاهده شد اما در سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم کاهشی در مقدار MIC مشاهده نشد (۳۸).

Dal در سال ۲۰۱۴ در ترکیه اثر مهار کننده‌های PAβN و NMP را بر روی ژن Ade B در ۴۰ جدایه *اسینتوباکتربومانی* و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف موردبررسی قرار داد و ملاحظه کرد

[14] فنیل آرژنین بتا نفتیل آمید

[15] carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

خاصیت ضدمیکروبی برخی آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با مهارکننده افلاکس به مقادیر قابل‌توجهی افزایش‌یافته ولی در آمینوگلیکوزیدها تغییر چشم‌گیری ملاحضه نمی‌شود. تأثیر مهارکنندهNMP درافزایش خاصیت ضدمیکروبی کینولون‌ها را بیش‌تر از PAβN گزارش کرده است (۸).

تفاوت نتایج در این مطالعه‌ها را می‌توان به تفاوت ماده مهارکننده پمپ‌افلاکس، نوع ژن فعال پمپ‌افلاکس در باکتری، القاء متفاوت مقاومت توسط داروهای مختلف، تغییر یا از دست دادن نفوذپذیری غشاء و غیره نسبت داد. در این مطالعه از IND و ANPs به‌عنوان ماده ضدمیکروبی و مهارکننده پمپ-افلاکس استفاده شد.

نانوذره‌های زیستی اولین بار در سال ۱۹۷۰ به‌دست آمد (۱۸). یکی از روش‌های نوین تولید نانوذره‌های پروتئینی روش جداسازی مرحله‌ای است که به‌وسیله دانشمندان آلمانی کشف شد (۱۰). آلبومین به‌علت زیست تخریب‌پذیر بودن در محصول‌های طبیعی، عدم سمیت، در دسترس و ارزان بودن بیش‌تر از سایر نانوذره‌های زیست تخریب‌پذیر استفاده می‌شود. هم‌چنین به‌علت خصوصیت‌های فیزیکی و بار سطحی، به‌عنوان حامل مناسبی برای داروهای آب‌گریز در آمده است (۲۲).

در مطالعه حاضر نانوذره آلبومین به‌تنهایی اثر ضمیکروبی بسیار خوبی بر باکتری *IRA* داشت اما در ترکیب با دارو به عنوان حامل فاقد اثر ضدمیکروبی بود.

در مطالعه Serna و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانوذره‌ها پروتئینی، فعالیت ضدمیکروبی قوی و گسترده‌ای را علیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت بدون هیچ اثر مضری روی سلول‌های پستانداران نشان دادند (۳۲). رحیم‌نژاد و همکاران در سال۱۳۹۲ نشان دادند که نانوذره‌های پروتئینی در حدود ۱۰۰ nm با خلوص بالا برای انتقال دارو مناسب هستند (۳۰). Mahal و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که ذره‌های پروتینی (zein+BSA) در ترکیب با نانوذره‌ها فعالیت ضدمیکروبی بسیار خوبی در برابر انواع سویه‌ها دارند و مواد زیست محیطی بسیار مهمی هستند (۲۱).

در این مطالعه برای بررسی فنوتیپی پمپ‌افلاکس از روش EtBr-agar CW استفاده شد.

Martins و همکاران در طی مطالعه‌های جداگانه در سال‌های ۲۰۱۱(۲۳) و ۲۰۱۳(۲۲) هم‌چنین دشتی‌زاده و همکاران درسال۱۳۹۳(۹) با این روش به بررسی فنوتیپی پمپ‌افلاکس در ایزوله‌های مختلف باکتریایی مقاوم به دارو پرداختند.

براساس این مطالعه‌ها روش کارت ویل در کنار تعیین فنوتیپی پمپ‌افلاکس که فنوتیپ MDR را در ایزوله‌های بالینی باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و منفی میانجی‌گری می‌کند؛ یک مقایسه سریع از فعالیت افلاکس را که در نتیجه جهش-های ایزوژنیک در آزمایشگاه (به‌واسطه پرتودهی مداوم، حذف یک ژن یا گروهی از ژن‌ها و یا رشد سویه باکتری در شرایط مختلف (دما، PH و غیره)) ایجاد می‌شود، فراهم می‌کند.

در این مطالعه برای اولین بار حضور ماده ضدمیکروبی (نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم و نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم)در ترکیب با سوسپانسیون میکروبی در روش EtBr-agar CW برای بررسی فنوتیپی مهار پمپ‌افلاکس توسط ماده ضدمیکروبی، بررسی شد.

در این بررسی مهار افلاکس در حداقل غلظت (۰/۵-۰ mg/l) EtBr دارای اهمیت بود زیرا در این غلظت تمامی پمپ‌های افلاکس قادر به دفع مقدار حداقلی EtBr هستند در نتیجه ماده‌ای که بتواند در این غلظت پمپ افلاکس را مهار و فلورسانس را گسیل کند مهار کننده خوبی است.

اگر چه مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است تنها به‌دلیل فعالیت پمپ‌های افلاکس چند دارویی نباشد اما با توجه به فعالیت حداکثری پمپ‌افلاکس در ۷۵٪ سویه‌های مورد مطالعه و مهار ۳۷٪ آن‌ها در حداقل غلظت EtBr توسط نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم با۰/۱۲۵ =MIC µg/ml و عدم مهار پمپ‌ها توسط نانوذره آلبومین- ایمی‌پنم، همکار ی و ارتباط بیان پمپ‌های افلاکس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نباید نادیده گرفته شود. هر چند بررسی ژنتیکی این پمپ‌ها و سایر عوامل دخیل از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز امری ضروری است.

نتیجه‌گیری

سهم افلاکس در مقاومت دارویی تعدادی از سویه‌های بالینی یکی از عواملی است که بایستی در طراحی آنتی‌بیوتیک‌های جدید یا هر ترکیب فعال دیگر در نظر گرفته شود. چالش اصلی ، کشف ترکیبی است که به‌عنوان مانع افلاکس در روش غیر اختصاصی، طیف وسیعی از سیستم‌های افلاکس گونه‌های مختلف باکتریایی را هدف قرار دهد (۲۲).

با توجه به نتایج این مطالعه ترکیب‌هایی مانند نانوذره آلبومین که علاوه‌بر اندازه و فرمولاسیون متفاوت نسبت به داروهای رایج، قابلیت انحلال در آب را هم دارند و می‌توانند از سد دیواره باکتری‌های گرم منفی عبور کنند گزینه مناسبی برای مهار پمپ‌های افلاکس هستند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از خانم اسلامی و کارشناسان آزمایشگاه دانشگاه علوم و تحقیقات ساوه به‌دلیل همکاری صمیمانه در اجرا این پژوهش کمال امتنان را دارند.

فهرست اختصارات:

1) MIC=Minimum inhibitory concentration

حداقل غلظت مهار کننده

2)CLSI= Clinical and Laboratory Standards Institute

موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی

3)TSA=Tryptic soy agar

4) Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

اسینتوباکتر بومانی مقاوم به ایمی پنم

5) Imipenem Nano Drug

نانوداروی ایمی پنم(نانوذره ی آلبومین-ایمی پنم)

6)MDR=Multi drug resistant

مقاومت چند دارویی

7) ANPs=Albumin Nano Particles

نانو ذرات آلبومین

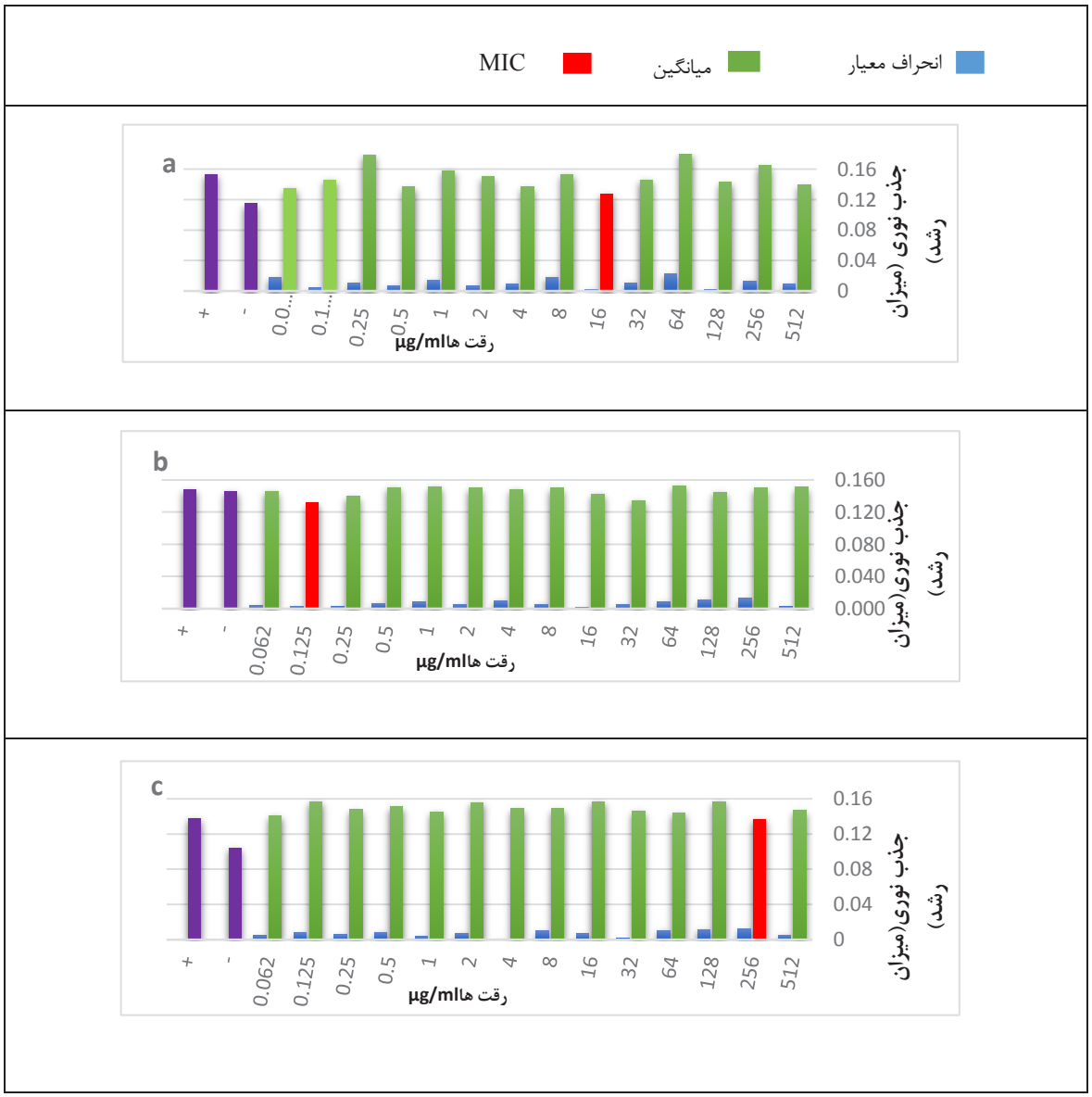
8)BSA=Bovine Serum Albumin

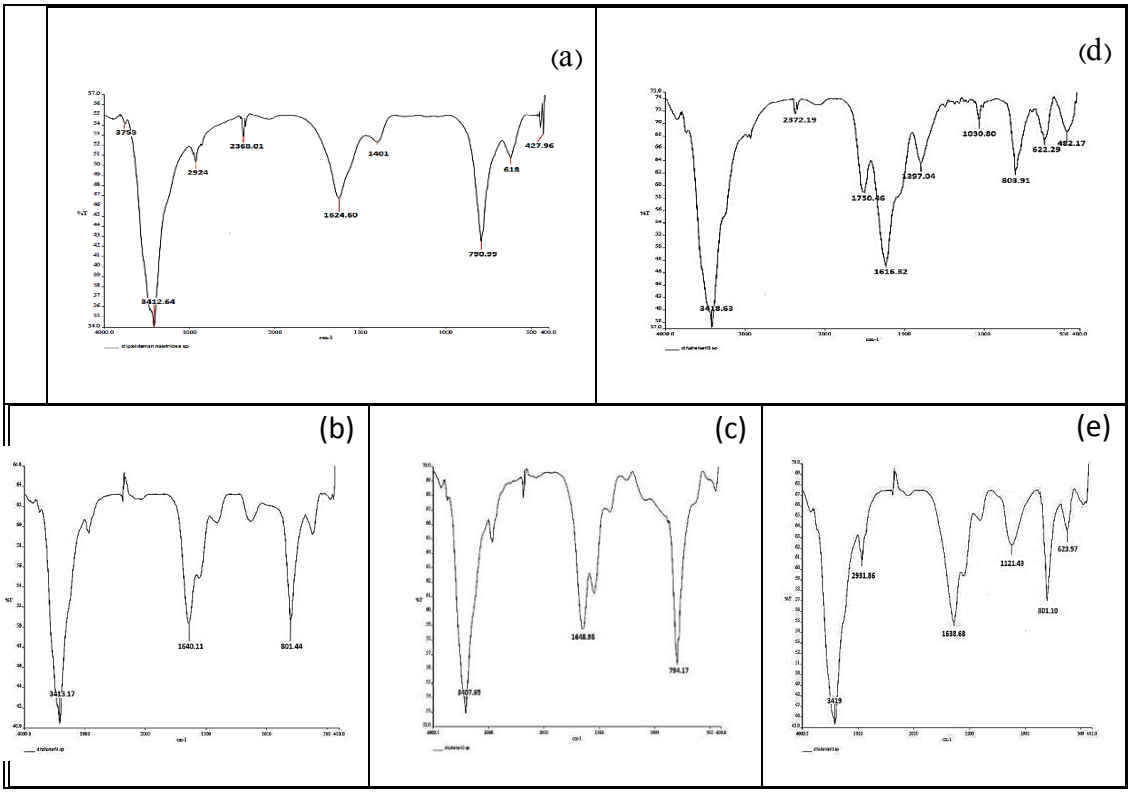
سرم آلبومین گاوی

9)EtBr=Ethidium Bromide

10)CW=Cartwheel

11)IMI=Imipenem


انحراف معیار
میانگین
MIC
a
b
c
جذب نوری (میزان رشد)
رقت ها µg/ml
+
-
0.062
0.125
0.25
0.5
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512



تصویر ۲: مجموعه طیف‌های FTIR

(a)BSA ,(b) ANP 0.05gr, (c) ANP 0.5gr, (d) IMI, (e) IND

.

a

EtBr (mg/l)	0	۰,۵	۱	۱,۵	۲
IRA					

b

EtBr (mg/l)	۰	۰,۲۵	۰,۵	۱,۵
ANP 0.5gr+*IRA*				
IND+ *IRA*				

تصویر ۳: نتایج بررسی پمپ افلاکس سویه‌های *IRA* به روش EtBr-agar CW

هر خط رشد متعلق به یک سویه است. رنگ قرمز بیانگر گسیل فلورسانس و مهار پمپ‌افلاکس و نبود آن بیانگر فعالیت پمپ‌افلاکس است.

(a)بدون عامل ضدمیکروبی (b) با عامل ضدمیکروبی

منابع

1.Athirah Nur A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2012; 6(7):258-261.

2.Binyu Yu. Synthesis of Ag–TiO2 composite nano thin film for antimicrobial application. Nanotechnology2011; 22:115603.

3.Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology.24th ed. The United States: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2007.

4.Chang Y N , Zhang M , Xia L , Zhang J. and Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. Materials, 2012, 5: 2850-2871.

5. Colvin V. The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. Nature Biotechnol J, 2003; 21(10):1166-1170.

6.Consales G, Gramigni E, Zamidei L, Bettocchi D, De Gaudio AR. A multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit: Antimicrobial and organizational strategies. J Crit Care. 2011; 26(5): 9-453.

7.Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564-82.

8.Dal T, Aksu B, Page`s J.M and Over-Hasdemir U. Expression of the adeB gene and responsiveness to 1 (1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanyl arginylb- naphthylamide in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2013; 1-3.

9.Dashti Zadeh Y, Moattari A, Gazzin G. Evaluation of phenotypic and genetic outbreaks of the episodes of pump and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among burn patients in Ghotbeddin Shirazi Hospital. J World News ,2014; 2(19):118-127.

10.Elber DL. Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. Acta Biomater 2011 Jan; 7 (1): 31-56.

11.Erfani Y, Safdari R, Choobineh H, Mirsalehian A, Rasti A, Einollahi N, Mirafshar M, Yazdan Yad H, Hamidian M, Soltanian A. Comparison of two methods of E.test and disc diffusion agar in determination of antibiotic susceptibility of *E. coli* strains isolated from patients with urinary tract infection referred to Shariati Hospital of Tehran. J Ibn Sina Clinical, 2008; 2(48):27-31.

12.Aslami K, Molaabas-Zade H, Hamidi M, BahmanAbadi R. Patern of sensitivity and resistant of *Acinetobacter* isolated from Azad hospital in Tehran 2010-2011. Iranian J of Infectious Dis 2014;19(46):1-5.

13.Filippove, M. P., 1992, Practical infrared spectroscopy of pectic substances, Food Hydrocolloids, 6, 115–142.

14.Garcia L, Juan C, Domenech A, Alberti S. Role of *Klebsiella pneumonia* LamB porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Age Chem 2011; 5-55:1803.

15.Gholami M.2013, Phenotypic and Molecular Analysis of AdelaBC and AdeIJK Infrared Pneumatics from Aminopenyl Resistant Acinetobacter Strains Isolated from Burned Patients Referring to Shahid Motahari Hospital in 2011-12, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.

16.Goodarzi H, Douraqi M, Dabiri H, Ghalavand Z. Evaluation of the expression and function of efflux pumps gene of multi-drug resistant isolates in non-cluster *Acinetobacter bemanemia*. J Research in Medicine, 2013;2:107-112.

17.Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2010; 93-65:1589.

18.Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomed Nanotech Biol Medicine 2005 Mar;1(1):22-30.

19.Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med. 2010;30(5): 498-506.

20.Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3375-80.

21.Mahal A[1], Goshisht MK, Khullar P, Kumar H, Singh N, Kaur G, Bakshi MS. Protein mixtures of environmentally friendly zein to understand protein-protein interactions through biomaterials synthesis, hemolysis, and their antimicrobial activities. Phys Chem Chem Phys. 2014 Jul 21;16(27):14257-70.

22.Martins M[1], McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, Amaral L. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. Open Microbiol J. 2013 Mar 22;7:72-82.

23.Martins M[1], Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, Pagès JM, Amaral L. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. In Vivo. 2011 Mar-Apr;25(2):171-8.

24.Moradi S. 2015, Molecular study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the samples of hospital infections and the study of the synergistic effect of the albumin-amino-penicillin nano-protein on it, Faculty of Agriculture, Saveh Branch Azad University.

25.Nakasao K, Okuyama M, Shimada S, Pratsinis E. Effect of reaction temperature on CVD-made TiO2 primary particle diameter. Chemical Engineering Science., 2003, 58: 3327-3335.

26.Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol. 2000; 31: 247-56.

27.Poirel L, Nordmann P. Carbapenemresistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006;12(9):826-36.

28.Rahimnejad M, Najafpour G, Jahan Shahi M. Production of protein nanostructures as drug carriers and optimization from top to bottom. J Qazvin Uni of Med Sciences, 2013; 6(71): 4-9.

29.Rancovic B, Kosanic A. Antimicrobial activities of different extracts of lecanoramuralis parmeliasulcata and parmeliopsisambigua. Pakistan J Botan2012; 44: 429-37.

30.Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. RT-PCR and statistical analyses of adeABC expression in clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. Microb Drug Resist2010;87:16-89.

31.S. Costa S. Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. Antibiotics 2013,2,83-99.

32.Serna N, Sanchez-Garcla L,Sanchez-chardi A, Unzueta U, Roldan M, Mangues R, Vazquez E, Villaverde A.Protein-only,antimicrobial peptid-contaning recombinant nanoparticles whit inherent buit-in antibacterial activity.Acta Biomater.2017 Jul 19.pii:S1742-7061(17)30464-6.dio:1016/j.actbio.2017.07.027.

33.Tiyaboonchai W., Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan dextran sulfate n anosuspensions, Int. J.pharm.,2008, 329:142-149.

34.Torchilin V.P. Multifunctional nanocarriers, Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, 58: 1532-1555.

35.Youssef M., Fattal E., Alonso M.J. Roblot-Treupel L., Sauzie`res J., Tancre`de C., et al. Effectivenes of nanosuspension-bound ampicillinin the treatment of Listeria monocytogenes infection in athymic nude mice, Antimicrob Agents Chemother, 1998,32:1204-1207.

36.Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: The molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries. 2009;3(5):335-41.

37.Zhang G, Niu A, Peng S, Jiang M, Tu Y, Li M, et al. Formation of novel polymeric nanoparticles. Acc Chem Res. 2001; 34(3): 249-56.

38.Zhu W[1], Wang H[2], Zhang JP[2].A comparison of adeB gene expression levels under conditions of induced resistance by different drugs in vitro in *Acinetobacter baumannii*. Exp Ther Med. 2017 May; 13(5): 2177–2182.